



[B] (11) KUULUTUSJULKAISU 57844  
UTLÄGGNINGSSKRIFT

C (45) Patentti myönnetty 10 10 1980  
Patent meddelat

(51) Kv.it.<sup>3</sup>/Int.Cl.<sup>3</sup> G 01 N 5/00

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus  
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus — Patentansöknin	762239
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	04.08.76
(23) Aikupäivä — Giltighetsdag	04.08.76
(41) Tulut julkaisti — Blivt offentlig	05.02.78
(44) Nähtävöskäpänön ja kuul.julkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	30.06.80
(32)(33)(31) Pyydetty suojetus — Begärd prioritet	

(71)(72) Osmo Antero Suovaniemi, Armas Lindgrenintie 15 A, 00570 Helsinki 57,  
Suomi-Finland(FI)

(74) Ruska & Co

(54) Menetelmä kemiallisten analyysien annostelu- ja mittaustarkkuuksien  
parantamiseksi - Förfarande för att förbättra kemiska analysers  
doserings- och mät noggrannhet

Tämä keksintö koskee menetelmää kemiallisten analyysien annostelu- ja mittaustarkkuuden parantamiseksi suoritettaessa yksi analyysi tai useita perättäisiä tai rinnakkaisia analyysyjä, joissa näytteitä ja reagenssia tai reagensseja sisältävien reaktioseosten mittaus suoritetaan yksi- tai monikanavaisessa valo-optisessa mittalaitteessa, kuten esimerkiksi fotometrissä, spektrofotometrissä, fluorometrissä tai nefelometrissä tai muulla sopivalla mittauseriaatella mittavassa mittalaitteessa.

Absorbtiofotometria, spektrofotometria, nefelometria ja fluorometria ovat yleisesti käytettyjä mittaustapoja laboratorioissa. Näihin mittaustapoihin sisältyy runsaasti erilaisia virheitä, joista kirjallisuudessa on monia raportteja (esim. Clin. Chem., 19, 832, 1973, 20, 1028, 1974 ja 21, 249, 1975).

Em. mittaustapoja on kehitetty yhä paremmiksi, jolloin mittaus siinänsä voidaan tehdä tarkasti. Samoin laitteet ovat kehittyneet yhä automaattisemmiksi ja mittatulosten käsittelyä on automatisoitu (Anal. Chem., 48, 661, 1976).

Edelleen suurena ongelmana on näytteiden ja reagenssien siirto ja mittaus enen varsinaista analyysiä. Samoin nesteen haihtuminen rea-

gensseistä ja näytteistä ennen mittausta ja sen kuluessa aiheuttavat suuria ongelmia, jotka ovat saaneet vain vähän huomiota osakseen.

Nykyisin näytteet ja reagenssit pipetoidaan joko manuellisesti tai automaattisesti. Pitepointi perustuu tilavuuden mittaamiseen. Pipetoinnin tarkkuus on nykyisellään tavallisimmin 1 µl:n luokkaa ja usein huonompi (Clin. Chem., 20, 320, 1974).

Pipetointituloksen tarkistaminen (feedback informaation saaminen) ei luonnollisesti ole mahdollista ja tällöin joudutaan luottamaan siihen, että pipetointilaitte on toiminut joka kerta oikein ja pipetoija on ollut aina yhtä huolellinen.

Kirjallisuudessa on kuvattu laitteisto, jossa tietokone ohjaa nesteannostelua. Tässä järjestelmässä painoanturi rekisteröi painot annosteltaville nesteille ja painoanturi on yhteydessä tietokoneen kautta nesteannostelijaan, jossa annosteltavat määrät voidaan ohjata halutun suuruiseksi 1,0 mg tarkkuudella (Anal. Chem., 48, 661, 1976). Kuvatussa järjestelmässä ei ole kyetty ratkaisemaan nesteiden haihtumisongelmaa.

Alussa esitetyissä mittauksissa näytteet, reagenssit ja reaktioseokset (näyte + reagenssit) ovat yleensä vesiliuoksina tai -suspensioina, joiden ominaisuudet (kuten lämpötila, pintajännitys, niissä olevien aineiden diffuusiovakiot ja pitoisuudet) vaikuttavat veden haihtumiseen niistä. Ympäristöolosuhteet (huoneen lämpötila, suhteellinen kosteus ja tuuletus) ja näyte- tai reagenssiastian ominaisuudet (läpimitta, korkeus, tiiveys ja materiaali, joka vaikuttaa nestepinnan muotoon ja täten pinta-alaan) määräävät myös, kuinka nopeasti nesteen haihtumista tapahtuu. Lisäksi nesteen haihtumiseen näytteistä, reagensseista ja reaktioseoksista vaikuttaa suuresti se, minkä tyyppinen ja miten rakennettu analyysilaitteisto on käytettävissä sekä kuinka kouliintuneita ja huolellisia näytteiden, reagenssien ja reaktioseosten sekä laitteistojen käsittelijät ovat. Nesteen (yleensä siis veden) haihtuminen nostaa liuoksien tai suspensioiden muiden aineiden pitoisuuksia ja prosentuaalisesti sitä enemmän, mitä vähemmän nestettä astiassa alkuaan on ollut.

Haihtumista analyysin eri vaiheissa ei siis voi jättää huomiotta olettamalla, että se on aina vakio ja vaikuttaa aina samalla tavalla esim. näyte- tai standardianalyyseissä.

Äskettäin on kirjallisuudessa mm. esitetty, että veden haihtuminen näyteliuoksista avonaisissa astioissa aiheuttaa virheitä analyysitulokseen jopa 25-50 % (Clin. Chem., 21, 1907, 1975).

Tutkimusta siitä, kuinka paljon itse analyysin eri vaiheissa näytteiden, reagenssien ja näistä muodostettavan reaktioseoksen haihtuminen aiheuttavat virheitä, ei ole vielä tehty.

Preliminääriset kokeet osoittavat, että tavallisimmin käytetyistä mittakyveteistä (kyvetin aukon pinta-ala  $1 \text{ cm}^2$ ) haihtuu reaktioseosta noin  $1 \text{ mg/min}$ . Toisin sanoen, jos  $1000 \text{ }\mu\text{l}$  reaktioseosta preinkuboidaan esim. 30 min, tänä aikana haihtuu noin  $30 \text{ mg}$  (noin 3 % reaktioseoksesta) aiheuttaen noin 3 %:n virheen analyysin lopputulokseen mitattaessa tavanomaisessa fotometrissä.

Tämän keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista seuraava sinänsä tunnettujen vaiheiden yhdistelmä:

- a) sopivimmin suljetussa tilassa säilytettävät näytteet ja reagenssit annostellaan pipetillä tai muulla tarkoitukseen soveltuvalla näytteiden tilavuuden mittaamiseen perustuvalla annostelijalla sopivimmin noin  $1 \text{ }\mu\text{l}$ :n tarkkuudella mittauskoeputkistoon, -kyvettiin, -kyvetistöön, erillisiin koeputkiin tai muihin astioihin,
- b) näytteiden painon määrittämiseksi vähintään  $0,1 \text{ mg}$ :n tarkkuudella kukin mittauskoeputki punnitaan ennen näytteen annostelua siihen ja näytteen kanssa välittömästi annostelun jälkeen ja kukin mittausputkisto tai -kyvetistö punnitaan vastaavasti ennen näytteen annostelua ja tämän jälkeen näytteineen aina kunkin siihen annostellun yksittäisen näytteen jälkeen,
- c) tarvittaessa reagenssin tai reagenssien painon määrittämiseksi vähintään  $0,1 \text{ mg}$ :n tarkkuudella suoritetaan mittauskoeputken, koeputkiston tai -kyvetistön punnitus välittömästi aina ennen kunkin yksittäisen reagenssimäärän annostelua ja välittömästi aina kunkin yksittäisen reagenssimäärän annostelun jälkeen,
- d) näytteiden ja mahdolliset reagenssien punnitustulokset siirretään punnituslaitteeseen ja mittalaitteeseen liitetyn tulostimen muistiin,
- e) reaktioseosten mittaus suoritetaan pystymittausperiaatteella, jolloin mittaussäde kulkee koeputken tai kyvetin pituusakselin suunnassa, ja
- f) punnitustulokset liitetään reaktioseosten mittauksiloksiin tulostimen laskenta-automatiikan ohjelman avulla, joka laskee analyysituloksen haluttuina yksikköinä.

Keksinnön mukaisella menetelmällä on ratkaistu em. ongelmat, jotka aiheutuvat reagenssien ja näytteiden pipetoinnin epätarkkuudesta ja annostelun feedback informaation puuttumisesta sekä reagenssien ja näytteiden haihtumisesta joko ennen analyysiä tai sen aikana.

Markkinoilla ei ole esimerkiksi entsyymi- tai kolorimetrianalyysia, jossa näyteannostelut tehtäisiin "karkeasti" pipetoiden ja näin pipetoidut määrät punnitaan ja punnitustulokset otettaisiin huomioon analyysitulosta laskettaessa.

Nykyisin päästään helposti noin 0,1 mg:n punnitsemistarkkuuteen, kun taas pipetoimalla tarkkuus on 1,0 µl:n luokkaa (noin 1,0 mg). Tarve pipetoida alle 1 µl:n näytemäärä on lisääntymässä etenkin näytteitä ja reagensseja säästävissä sekä yhä enemmän käyttöön tulevilla mikromenetelmissä. Näiden mikromenetelmien kehittymisen ja käyttöönoton esteenä on ollut suuressa määrin ja tulee olemaan pipetoinnin suuri epätarkkuus pienillä näytetilavuuksilla. Suuren viskositeetin omaavia nesteitä tai kiinteitä aineita ei luonnollisesti voida pipetoida.

Tämän keksinnön mukaisen menetelmän soveltaminen esim.

- parantaa analyysitarkkuutta
  - lisää analyysin kontrollointimahdollisuutta (feedback informaatio)
  - mahdollistaa uusien, kuten ELISA ja EMIT, analyysimenetelmien nopean kehittymisen ja käyttöönoton
  - mahdollistaa vanhojen makromenetelmien muuttamisen mikromenetelmiksi
  - mahdollistaa monien määritysten, kuten jyvän proteiinipitoisuuden määrittäminen, käyttämisen screening-mikromenetelmänä
  - vähentää kontrollianalyysien tarvetta
  - parantaa työviihtyvyyttä ja luottamusta analyysimenetelmiin
  - vähentää henkilökunnantarvetta
- jne.

Keksintöä selostetaan lähemmin seuraavassa viitaten oheiseen piirustukseen, jossa kuva 1 esittää perspektiivikuvana kaaviollisesti keksinnön mukaisessa menetelmässä sovellettavaa optista järjestelmää ja kuva 2 esittää suuremmassa mittakaavassa menetelmässä käytettävää kyvetistöä.

Piirustuksessa on viitenumerolla 1 merkitty detektoreita, numerolla 2 linssejä ja numerolla 3 kyvetistöä, jossa on yhdeksän kyvetiä 11.

Kyveteissä on näytettä 4. Kuituoptiikka 5 johtaa suodattimelta 6 tulevan valon kyvettien läpi. Valonlähteenä on lamppu 10, jolta tulevaa valoa katkotaan rei'itetyn levyn 9 avulla ja johdetaan linsien 7 ja suodattimen 6 kautta kuituoptiikalle 5.

Kyvetistössä 3 on yhdeksän tasaisella optisella ikkunalla 12 varustettua kyvettiä 11. Ikkuna 12 on suojattu reunuksella 13. Kyvetistössä on lisäksi identifiointia varten lovi 14.

Seuraavassa selostetaan erästä sovellutusesimerkkiä keksinnön mukaisesta menetelmästä:

- 1.) Näytteet ja reagenssit säilytetään kansilevyllä varustetussa koeputkistossa. Koeputkisto sisältää yhdeksän erillistä putkea, jotka ovat kiinteästi tai irrotettavasti määrätäisyyksillä kannatinlevyissä ja jokainen putki voidaan erikseen sulkea kansilevyssä olevalla tulpalla. Ennen analyysiä näytteet tai reagenssit eivät pääse haihtumaan emistään koeputkiston yhdeksästä putkesta.
- 2.) Näytteet pipetoidaan peräkkäin koeputkistosta toisen koeputkiston putkiin, kyvetistöön tai erillisiin putkiin. Jokaisen pipetoinnin jälkeen punnitaan pipetoitu määrä ja punnitustulos siirretään tulostimen muistiin.

Kuten aikaisemmin esitetystä selviää, nykyisellään pipetointitarkkuus on 1  $\mu$ l:n (noin 1 mg) luokkaa, kun taas punnitseminen voidaan nykyisillä laitteilla suorittaa helposti 0,1 mg:n tarkkuudella (erikoisvaoilla saavutetaan jopa 0,1  $\mu$ g:n tarkkuus). Esim. 0,1 mg:n punnitustarkkuus on noin kymmenen kertaa parempi kuin 1,0  $\mu$ l:n pipetointitarkkuus. Lisäksi, kun "karkeaa" näytteen pipetointia seuraa vielä tarkka punnitseminen, tarkkuuden lisääntymisen ohella punnitseminen antaa myös feedback informaatiota pipetoinnin onnistumisesta.

Korkean viskositeetin omaavat tai muuten vaikeasti pipetoitavissa olevat näytteet voidaan aina punnita tarkasti epätarkemmankin pipetoinnin jälkeen ja analyysin lopputulosta laskettaessa huomioidaan punnitustulos. Kiinteitä näytteitä ei luonnollisesti voida pipetoida, vaan ne on punnittava.

- 3.) Sekä näytteiden että reagenssien pipetointivirheet ja myös niiden haihtuminen reaktioseoksesta (näyte + reagenssit) aiheuttavat virheitä analyysitulokseen, jos mitataan kyvetissä, jossa mittaussäde kulkee vaakasuorassa ensin toisen kyvetin seinämän, sitten mitattavan nesteen ja lopuksi toisen kyvetin seinämän läpi detektorille (vaakamittausperiaate). Tällöin absorbanssi voidaan laskea Beer'in laista

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c \quad (1)$$

A = absorbanssi ( $\log I_0/I$ )

$\epsilon$  = molaarinen absorptiviteetti

l = valotien pituus (kyvetin seinämien etäisyys toisistaan)

c = absorboivan aineen pitoisuus

Tällöin yhtälöstä havaitaan, että jos reaktioseosta haihtuu, absorboivan aineen pitoisuus (c) kasvaa ja aiheuttaa virheen absorbanssiin (A). Samoin näytteen tai reagenssin pipetointivirheet aiheuttavat pitoisuuteen (c) ja samalla lopputulokseen virheen.

Sitävastoin, jos mitataan pystymittausperiaatteella, mittaussäde kulkee tasapaksun, esim. sylinterimäisen kyvetin pituusakselin suunnassa, ensin kyvetin pohjan (optinen ikkuna) läpi, sitten kyvetissä olevan nesteen ja sen vapaan pinnan kautta detektorille (säteen päinvastainen kulku on myös mahdollinen: ensin vapaan nestepinnan ja nesteen kautta ja sitten kyvetin optisen ikkunan kautta detektorille). Kuvassa 1 on eräs esimerkki pystymittausperiaatteella varustetun absorbtiofotometrin optiikasta. Kuvassa 2 on esitettyä analysaattorissa käytettävä kyvetistö, jossa kannatinlevyssä on kiinteästi yhdeksän kyvetiä määrätäisyyksin. Fluorometriassa filtterin tai monokromaattorin kautta tullut primäärisäde (eksitaatio) voi kulkea pystysuorassa ja sekundäärisäde (emissio) nesteestä kyvetin pystyseinämän läpi vaakasuorassa filtterin tai monokromaattorin kautta detektorille tai päinvastaisessa suunnassa.

Beer'in laki voidaan johtaa seuraavaan muotoon.

Beer'in laki

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

voidaan muuntaa huomioimalla, että

$$c = \frac{m}{v} \text{ ja } l = \frac{v}{a}, \text{ joissa}$$

$m$  = absorboivan aineen massa ( $\mu\text{mol}$ ), joka on analysoitavan aineen massa kyvetissä

$v$  = reaktioseoksen tilavuus kyvetissä, ml

$a$  = kyvetin pohjapinta-ala ( $= 0,750 \pm 0,002 \text{ cm}^2$  kuvan 2 mukaisessa kyvetistössä)

yhtälömuotoon

$$A = \frac{\epsilon}{a} \cdot m \quad (2)$$

Analyyseissä, joissa ei käytetä hyväksi mitattavan aineen molaarista absorbtiviteettiä ( $\epsilon$ ), vaan mittausarvoja verrataan standardikäyrien antamiin mittausarvoihin, voidaan standardikuvaaja ilmaista muodossa

$$A = f(m) \quad (3)$$

Yleensä kuitenkin mitataan alueella, missä standardikäyrä on lineaarinen. Tällöin, jos standardisuoran kulmakerrointa merkitään  $k$ :lla, yhtälö saa muodon

$$A = k \cdot m \quad (4)$$

Työskentelykerroin (working coefficient)  $\epsilon/a$  tai kulmakerroin  $k$  voidaan määrittää kullekin analyysimenetelmälle erikseen ja ne ovat myös käytännössä laitekohtaisia vakioita.

Yhtälöstä

absorbanssi = vakio  $\times$  mitattavan aineen massa havaitaan, että absorbanssi on vain riippuvainen kyvetissä olevan mitattavan aineen massasta ( $m$ ). Mitattaessa pystymittausperiaatteella kyvetissä olevan mitattavan aineen pitoisuus ( $c$ ) ei siis vaikuta absorbanssiin ja sitä kautta lopputulokseen. Kun kyvetistä tapahtuu veden haihtumista, mitattavan aineen pitoisuus ( $c$ ) kasvaa, mutta massa ( $m$ ) pysyy muuttumattomana.

Veden haihtuminen reaktioseoksesta analyysin aikana ei siis aiheuta virhettä mitattaessa pystymittausperiaatteella mitaussä-

teen suunnassa tasapaksussa kyvetissä, jossa veden haihtuminen lyhentää valotien pituutta reaktioseoksessa ja tämä valotien lyheneminen lisää samassa suhteessa mitattavan aineen pitoisuutta (vrt. yhtälöön  $A = \epsilon \cdot l \cdot c$ , jossa  $\epsilon$  = vakio,  $l$  = valotien pituus ja  $c$  = mitattavan aineen pitoisuus).

Kun reaktioseosta valmistettaessa reagenssien pipetoinnissa on tullut virheitä, niin reaktioseoksessa mitattavan aineen pitoisuuteen tulee virhe, mitattavan aineen massa ( $m$ ) sitävastoin säilyy muuttumattomana kyvetissä. Tällöin kun mitataan pystymittausperiaatteella, mittausaallonpituudella ei-absorboivien reagenssien pipetointivirheet kompensoituvat ja näin ollen eivät aiheuta virhettä lopputulokseen.

Kun reaktioseoksesta (näyte + reagenssit) haihtuu vettä analyysin eri vaiheissa, esim. sentrifugaation, preinkubaation, odotusten ja mittauksen aikana, reaktioseoksessa mitattavan aineen pitoisuus ( $c$ ) kasvaa ja jälleen sen massa ( $m$ ) pysyy muuttumattomana. Pystymittausabsorptiofotometrissä (kuten muissakin pystymittausperiaatteella varustetuissa em. laitteissa) tämäkin virhe kompensoituu, koska siinä mitataan liuoksessa olevan, mitattavan aineen massaa ( $m$ ). Samasta syystä mitattaessa pystymittausperiaatteella, kompensoituvat myös haihtumisesta johtuvat reagenssien pitoisuuksien muutokset.

Seuraavassa esitetään yhteenvetona parannukset, jotka saavutetaan edellä kuvatussa sovellutusesimerkissä:

- 1.) Kansilevyllä varustetusta koeputkistosta vesi ei pääse haihtumaan näytteistä, jolloin välttyään jopa 25-50 % virheeltä analyysin lopputulokseen. Samoin estetään veden haihtuminen reagensseista.
- 2.) Näytteet voidaan mitata punnitsemalla esim. kymmenen kertaa tarkemmin kuin pipetoimalla ja samalla saadaan feedback informaatiota pipetoinnin onnistumisesta.

Etenkin pienet näytemäärät, esim. alle 20  $\mu$ l (noin 20 mg), voidaan annostella esim. 0,1 mg tarkkuudella. Fluorometrisissä mittauksissa, joissa herkkyys saattaa olla  $10^3$ -( $10^4$ ) kertaa suurempi kuin fotometrisissä mittauksissa, näytettä voidaan usein tarvita esim. vain 1  $\mu$ l, jolloin näytteen punnitseminen



on välttämätöntä, jotta välttyään liian suurelta virheeltä lopputuloksessa (1 ml:n suuruista näytettä pipetoitaessa virhe voi olla yli 50 %).

- 3.) Jos näyte on kiinteä tai muuten vaikeasti pipetoitavissa, näytteen punnitseminen on ainoa ratkaisu sen tarkkaan annosteluun. Analyysin lopputulosta laskettaessa tässäkin otetaan huomioon laskimessa laitteen antama mittalukema ja näytteen punnitustulos. Näin voidaan toimia, kun määritetään esim. jyvän proteiinipitoisuutta DBC-menetelmällä (J. Biol. Chem., 154, 239, 1944, Cereal Chem., 33, 190, 1956, J. Sci. Food Agric., 10, 425, 1959, Brit. J. Nutr., 18, 537, 1964, Curr. Sci., 38, 330, 1969 ja IAEA-PL-570/17, 145, 1975).
- 4.) Mittausaallonpituudella ei-absorboivien reagenssien pipetointivirheet (usein 1-5 %) eivät aiheuta virhettä lopputulokseen mittaattaessa pystymittausperiaatteella. Mittausaallonpituudella absorboivat reagenssit voidaan tarvittaessa myös punnita pipetoinnin jälkeen.
- 5.) Reaktioseoksesta nesteen haihtuminen analyysin eri vaiheessa ei aiheuta virhettä lopputulokseen pystymittauksen ansiosta. Edellä kuvatuissa vaakamittausperiaatteella toimivissa laitteissa esim. 1,0 - 0,3 ml:n reaktioseoksesta haihtuminen analyysin aikana aiheuttaa noin 3 - 10 % virheen, jos analyysi vie aikaa 30 min ja kyvetin aukko on 1 cm<sup>2</sup>.

Tunnusomaista edellä kuvatulle menetelmäkeksinnölle siis on se, että

- 1.) Näyte pipetoidaan ja punnitaan sekä punnitustulos siirretään laskimen muistiin. Kiinteät näytteet vain punnitaan. Säilytykseen käytetään suljettua koeputkistoa.
- 2.) Reagenssit pipetoidaan ja tarvittaessa punnitaan sekä punnitustulokset siirretään laskimen muistiin.
- 3.) Reaktioseoksen (näyte + reagenssit) mittaus suoritetaan pystymittausperiaatteella, jossa

absorbanssi = vakio x mitattavan aineen massa.

Sama pätee myös, vaikka mitattaisiin pystymittausperiaatteella esim. emissiota (fluorometria), sameutta (nefelometria) tai sakkaa (esim. vasta-aine- tai veriryhmämittaukset). Lisäksi

mittaukset voivat olla tasapaino (end point)- tai kineettisiä (esim. kineettinen entsyymimittaus) -mittauksia.

- 4.) Laskentavaiheessa laskimen ohjelma ottaa muistista huomioon sekä mittatuloksen että näytteen punnitustuloksen sekä tarvittaessa myös reagenssien punnitustulokset tulostaen analyysiarvot halutuiksi yksiköiksi laskettuina.

Luonnollista on, että edellä kuvattua menetelmäkeksintöä voidaan soveltaa manuelleissa ja semi- tai täysautomaattisissa laitteistoissa, jotka lisäksi voivat olla yksi- tai monikanavaisia (suorittaa samanaikaisesti useita samoja, eri potilaiden analyyskejä tai saman potilaan useita eri analyyskejä).

Keksinnön mukaisessa menetelmässä sekä punnitussysteemi että analyysilaitte ovat liitettynä ohjelmoivaan tulostimeen tai mikroprosessoriin, jolloin analyysituloksen laskentaan liittyy näytteen paino (tarvittaessa myös reagenssien painot) ja lukema mittauslaitteesta, joka toimii pystymittausperiaatteella.

Tämän keksinnön mukaista menetelmää voidaan myös soveltaa siten, että reagenssit lisätään kuiva-aineina, jolloin säästytään liuosten tekemiseltä. Usein myös monet reagenssit liuoksina hajoavat nopeasti, muuttavat ominaisuuksiaan tai alkavat kasvaa mikro-organismeja. Jos reagenssit voidaan lisätä kuiva-aineina, tämä säästää reagenssikulutusta, koska yleensä osalla tehdyistä reagenssiluoksista on taipumus jäädä käyttämättä tai vanhentua ja pilaantua.

Koska fluorometriset mittaukset ovat noin 1000 kertaa herkempiä kuin kolorimetriset mittaukset, tällöin fluorometriassa näytemäärä voi olla usein vain milligramman osia. Nykyisillä pipetointisysteemeillä näin pienien määrien tarkka annostelu on mahdotonta. Tässäkin näytteen "epätarkka" pipetointi ja sitä seuraava punnitseminen sekä punnitustuloksen huomioiminen analyysin lopputulosta laskettaessa olisi ratkaisu, joka parantaisi erittäin paljon analyysitarkkuutta.

Samoin monissa immunomäärityksissä, kuten RIA (radioimmunoassay), ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) ja EMIT (enzyme multiple immunoassay technique), herkkyys on hyvin suuri, jolloin näytteen määrän täytyy olla muutama milligramma tai milligramman osia. Näidenkin määritysten tarkkuuden ja käyttökelpoisuuden esteenä on suureksi osaksi suuri epätarkkuus pienen näytemäärän ja joskus myös reagenssien annostelussa.

Keksinnön mukaista menetelmää on mahdollista soveltaa myös esim. kromatografiamenetelmissä, joissa kromatografiapylvääseen (seuin mikropylväs tai -pylväitä) asetetaan pipetoitu ja sen jälkeen tarkasti punnittu määrä tiettyä aineeseosta. Fraktioinnissa aineosaset voidaan kerätä esim. yhdeksän pylvään ryhmästä kyvetistöön tai koeputkistoon. Kyvetistöihin kerätyt fraktiot voidaan mitata esim. pystymittausfotometrissä. Tässäkin järjestelmässä näytteet on voitu punnita tarkasti ja fraktioiden keräysten aikana veden haihtuminen fraktioista ei aiheuta lopputuloksiin virheitä mitattaessa pystymittausperiaatteella.

Myös edellä kuvatuissa järjestelmissä "karkeasti" pipetoidut näyttemäärät punnitaan (tarvittaessa punnitaan myös pipetoidut reagenssit tai kiinteät aineet yksinomaan punnitaan) ja reaktioseos mitataan pystymittausperiaatteella toimivassa laitteistossa.

Tämä keksinnön mukainen järjestely voidaan toteuttaa käsikäyttöisissä, puoli- tai täysautomaattisissa laitteistoissa. Tulostusvaiheessa otetaan huomioon näytteestä saatu punnitustulos (tarvittaessa myös reagensseista) ja se liitetään tulostuksessa pystymittausperiaatteella toimivan mittalaitteen antamaan mittalukemaan. Tulostuksen automaatioaste voi olla käsikäyttöisestä täysin automaattiseen. Järjestelmään on myös helppo liittää tarvittavat näytteiden identifikaatiolaitteet.

#### Patenttivaatimus

Menetelmä kemiallisten analyysien annostelu- ja mittaustarkkuuden parantamiseksi suoritettaessa yksi analyysi tai useita perättäisiä tai rinnakkaisia analyyysejä, joissa näytteitä ja reagenssia tai reagensseja sisältävien reaktioseosten mittausta suoritetaan yksi- tai monikanavaisessa valo-optisessa mittalaitteessa, kuten esimerkiksi fotometrissä, spektrofotometrissä, fluorometrissä tai nefelometrissä tai muulla sopivalla mittauseriaa- teella mittaavassa mittalaitteessa, t u n n e t t u seuraavasta sinänsä tunnettujen vaiheiden yhdistelmästä,

a) sopivimmin suljetussa tilassa säilytettävät näytteet ja reagenssit annostellaan pipetillä tai muulla tarkoitukseen soveltuvalla näytteiden tilavuuden mittaamiseen perustuvalla annostelijalla sopivimmin noin 1 µl:n tarkkuudella mittauskoeputkistoon, -kyvettiin,

-kyvetistöön, erillisiin koeputkiin tai muihin astioihin,

b) näytteiden painon määrittämiseksi vähintään 0,1 mg:n tarkkuudella kukin mittauskoeputki punnitaan ennen näytteen annostelua siihen ja näytteen kanssa välittömästi annostelun jälkeen ja kukin mittausputkisto tai -kyvetistö punnitaan vastaavasti ennen näytteen annostelua ja tämän jälkeen näytteineen aina kunkin siihen annostellun yksittäisen näytteen jälkeen,

c) tarvittaessa reagenssin tai reagenssien painon määrittämiseksi vähintään 0,1 mg:n tarkkuudella suoritetaan mittauskoeputken, koeputkiston tai -kyvetistön punnitus välittömästi aina ennen kunkin yksittäisen reagenssimäärän annostelua ja välittömästi aina kunkin yksittäisen reagenssimäärän annostelun jälkeen,

d) näytteiden ja mahdolliset reagenssien punnitustulokset siirretään punnitulsiatteeseen ja mittalaitteeseen liitetyn tulostimen muistiin,

e) reaktioseosten mittaus suoritetaan pystymittausperiaatteella, jolloin mittaussäde kulkee koeputken tai kyvetin pituusakselin suunnassa, ja

f) punnitustulokset liitetään reaktioseosten mittautuloksiin tulostimen laskenta-automaatiikan ohjelman avulla, joka laskee analyysituloksen haluttuina yksikköinä.

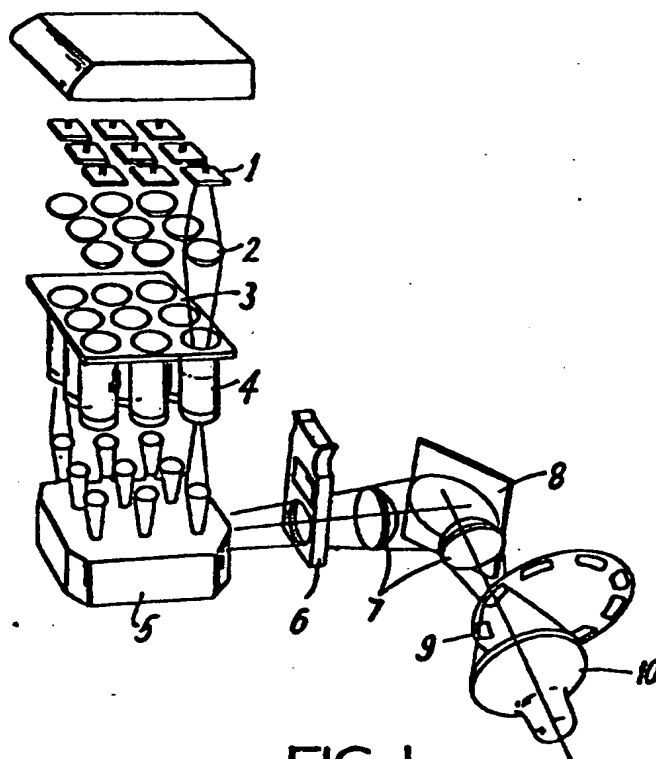


FIG. 1

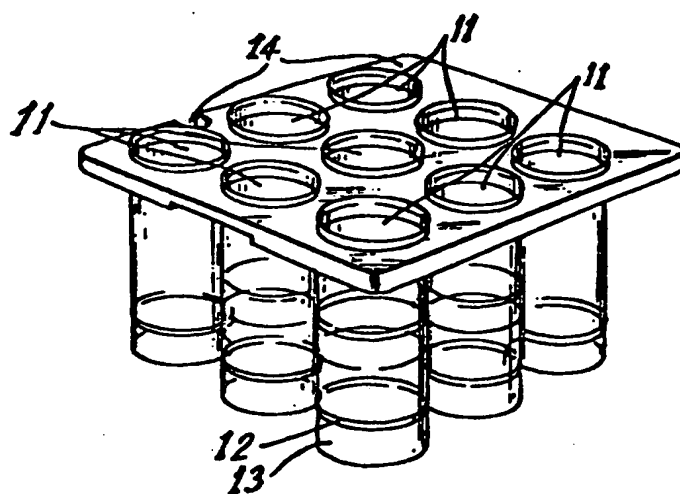


FIG. 2